DOI:10.16016/j.1000-5404.201509029

胆固醇敏感器 SCAP 功能失调对 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达的影响

欧阳南[1],杜晓刚[1],陈利群[1],周 超[2] (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院:肾脏内科[1],心血管内科[2])

[摘要] **目的** 观察胆固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(sterol regulatory element binding proteins cleavage-activating protein,SCAP)功能失调对 THP-1 源性巨噬细胞脂质代谢及 IL-1β、MCP-1 表达的影响,探讨 SCAP 的促炎作用是否依赖于其介导的胆固醇稳态调节功能。**方法** 采用基因转染方法在 THP-1 源性巨噬细胞中过表达 SCAP 或沉默 SCAP,结合使用炎症刺激剂 LPS(1 μg/mL)或 SCAP 转位抑制剂 Betulin(3 μmol/L)处理 THP-1 源性巨噬细胞,将细胞分为对照组、过表达 SCAP 组、沉默 SCAP 组、LPS 组、沉默 SCAP + LPS 组、Betulin 组以及过表达 SCAP + Betulin 组,RT-PCR 法检测过表达 SCAP 或沉默 SCAP 对 HMGCoAR、pro-IL-1β、MCP-1 基因表达水平的影响。油红 O 染色观察不同组别细胞内中性脂质沉积的变化。酶法定量测定胞内胆固醇含量。Western blot 法检测 SCAP、pro-IL-1β 以及培养上清中 IL-1β 的蛋白水平。**结果** ①过表达 SCAP 组与对照组比较,其 HMGCoAR、MCP-1、pro-IL-1β 基因表达水平升高($P<0.01$),细胞内 pro-IL-1β 及细胞培养上清中 IL-1β 蛋白含量均上升($P<0.05$),且细胞内总胆固醇(total cholesterol,TC)及胆固醇酯(cholesterol ester,CE)含量上升($P<0.01$)。②沉默 SCAP 组与对照组比较,HMGCoAR、MCP-1、pro-IL-1β 基因表达水平下降($P<0.05$),细胞内 pro-IL-1β 及培养上清中成熟 IL-1β 蛋白含量均降低($P<0.05$),且细胞内中性脂质蓄积减少,TC 及 CE 含量下降($P<0.05$);沉默 SCAP + LPS 组与 LPS 组比较,MCP-1、pro-IL-1β 基因表达下调($P<0.05$),成熟 IL-1β 蛋白水平下降($P<0.05$)。过表达 SCAP + Betulin 组与过表达 SCAP 组比较,HMGCoAR 基因表达水平下降($P<0.05$),其细胞内,TC 及 CE 含量亦下降($P<0.05$),但 MCP-1、pro-IL-1β 基因表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),培养上清中成熟 IL-1β 蛋白含量差异也无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 胆固醇敏感器 SCAP 功能失调促进 THP-1 源性巨噬细胞内炎症因子 IL-1β、MCP-1 表达,增加成熟 IL-1β 的生成及其向细胞外分泌;SCAP 这一新发现的功能不依赖于其介导的胆固醇稳态调节功能。

[关键词] 胆固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白;白介素-1β;炎症;脂质代谢;巨噬细胞
[中图法分类号] R341; R392.11; R392.3 [文献标志码] A

Dysfunction of sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein promotes expression of inflammatory cytokines in THP-1 macrophages

Ouyang Nan[1], Du Xiaogang[1], Chen Liqun[1], Zhou Chao[2] ([1]Department of Nephrology, [2]Department of Cardiovascular Diseases, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effects of the dysfunction of sterol regulatory element-binding protein (SREBP) cleavage-activating protein (SCAP) on the expression of inflammatory cytokines, IL-1β and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), in THP-1 macrophages, and investigate whether its pro-inflammatory effect depends on its mediated regulation of cholesterol homeostasis. **Methods** Gene transfection was used to over-express or knock-down SCAP in THP-1 macrophages. After THP-1 macrophages were treated with inflammatory stimulus, LPS (1 μg/mL) or translocation inhibitor, betulin (3 μmol/L, a chemical which inhibits SCAP translocation from endoplasmic reticulum to Golgi specifically). The THP-1 macrophages were divided into control group, SCAP over-expression group, SCAP knocking-down group, SCAP knocking-down plus LPS group, and SCAP over-expression plus betulin group. The mRNA expression of

[基金项目] 国家自然科学基金青年科学基金(81500341)
[通信作者] 周 超,E-mail:zhouchao2008@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20151207.1701.024.html(2015-12-07)

SCAP, HMGCoAR, pro-IL-1β and MCP-1 were determined after over-expression or knocking-down of SCAP by real-time PCR. The accumulation of neutral lipid droplets in the cells was observed by Oil Red O staining. The contents of intracellular total cholesterol (TC), free cholesterol (FC) and cholesterol ester (CE) were determined by quantitative assays. The protein expression of SCAP and pro-IL-1β, and the mature IL-1β level in the supernatants were measured by Western blotting. **Results** Over-expression of SCAP significantly increased the expression of HMGCoAR, pro-IL-1β and MCP-1 at mRNA level ($P<0.01$), the contents of intracellular pro-IL-1β and mature IL-1β in the supernatants ($P<0.05$), and intracellular TC accumulation and CE contents in SCAP over-expressed macrophages. Knocking-down SCAP dramatically decreased the expression of HMGCoAR, pro-IL-1β and MCP-1 at mRNA level ($P<0.05$), the contents of intracellular pro-IL-1β and mature IL-1β in the supernatants ($P<0.05$), and intracellular TC accumulation and CE contents in SCAP knocking-down macrophages. The expression of MCP-1 and pro-IL-1β and the content of mature IL-1β were lower in the knocking-down plus LPS group than the LPS group ($P<0.05$). Betulin treatment effectively suppressed the mRNA expression of HMGCoAR ($P<0.05$) and decreased the contents of intracellular TC and CE ($P<0.05$), but had no effect on the expression of pro-IL-1β and MCP-1 and level of mature IL-1β in the supernatants ($P>0.05$). **Conclusion** Cholesterol sensor SCAP dysfunction promotes the expression of IL-1β and MCP-1, and enhances the production and secretion of mature IL-1β. Our findings suggest that this new function of SCAP is independent of its mediated regulation of cholesterol homeostasis.

[**Key words**] sterol regulatory element-binding protein cleavage-activating protein; IL-1β; inflammation; lipid metabolism; macrophages

Supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81500341). Corresponding author: Zhou Chao, E-mail: zhouchao2008@hotmail.com

脂代谢紊乱与炎症是加速动脉粥样硬化性疾病进展的重要危险因素[1]。胆固醇调节元件结合蛋白裂解激活蛋白(sterol regulatory element binding proteins cleavage-activating protein,SCAP)是调节真核细胞脂质代谢稳态的关键分子。本课题组前期研究证实,在炎症、糖尿病等病理状态下,SCAP 表达增高或异常糖基化修饰,使低密度脂蛋白受体(low density lipoprotein receptor,LDLr)和 3-羟基-3-甲基-戊二酰辅酶 A 还原酶(3-hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase,HMGCoAR)表达增加,细胞内源性胆固醇合成增加,破坏细胞内胆固醇稳态,最终引起巨噬细胞[2]、血管平滑肌细胞[3]、肾小球系膜细胞[4]和肝细胞脂质异常大量蓄积,介导组织器官的脂质毒性损伤。近年研究报道,在小鼠脂肪肝模型中,胆固醇调节元件结合蛋白 2(sterol regulatory element binding protein2,SREBP2)表达上调,其炎症反应增加[5],提示 SCAP/SREBP2 信号通路可能与激活炎症反应有关。炎症与 SCAP 介导的胆固醇稳态调节之间存在交互作用[6]。本研究通过在 THP-1 源性巨噬细胞中过表达 SCAP 及沉默 SCAP,探讨 SCAP 功能失调在炎症反应中的作用。

1 材料与方法

1.1 THP-1 源性巨噬细胞的培养

THP-1 细胞(ATCC,USA)培养于 RPMI1640(10%胎牛血清)培养基,经 160 nmol/L 佛波酯(PMA)诱导分化 48 h,成为形态与功能典型的 M1 型巨噬细胞。PBS 洗涤细胞 2 次后,用于后续实验。实验培养基为含 0.2% 牛血清白蛋白(BSA,Sigma)的 RPMI1640,即无血清培养基(Serum free medium,SF 培养基)。

1.2 过表达 SCAP 质粒的转染

将 THP-1 源性巨噬细胞分为对照组与过表达 SCAP 组,采用 Effectene Transfection Reagent 转染试剂盒(Qiagen,German),按照说明书步骤分别转染空白对照质粒(pcDNA3.1,由重庆医科大学感染性疾病分子生物学实验室提供)及过表达 SCAP 质粒(ATCC,USA)。16 h 后予细胞换液,SF 培养基中孵育 8 h。Betulin(Sigma,USA)是 SCAP 从内质网向高尔基体转位的特异性抑制剂[7]。按照不同组别分别加入新鲜 SF 培养基或含 Betulin(3 μmol/L)的 SF 培养基处理 24 h。

1.3 SCAP-siRNA 的转染

THP-1 源性巨噬细胞分为对照组、LPS 组、沉默 SCAP 组、沉默 SCAP + LPS 组 4 组。采用 siRNAHiperfect Transfection Reagent 转染试剂盒(Qiagen,German),按照说明书步骤,对照组及 LPS 组予以转染对照-siRNA(Santa Cruz,USA),沉默 SCAP 组及沉默 SCAP + LPS 组予以转染 SCAP-siRNA(Santa Cruz,USA)。16 h 后予细胞换液,SF 培养基中孵育 8 h。LPS 是刺激 THP-1 源性巨噬细胞炎症因子表达的强刺

激剂[8],按照不同组别分别加入新鲜 SF 培养基或含 LPS(1 μg/mL)的 SF 培养基处理 24 h。

1.4 油红 O 染色

培养于 8 孔 chamber slide 中的 THP-1 源性巨噬细胞,经 4% 多聚甲醛固定,0.2% 油红 O 染色 15 ~ 30 min,苏木精复染,光镜下观察组织、细胞内中性脂质蓄积情况。

1.5 酶法定量测定细胞内胆固醇含量

6 孔板内各组细胞处理 24 h 后收集细胞,重悬细胞沉淀于氯仿/甲醇液 1 mL 中。超声波破碎细胞,置样品于摇床室温震荡,离心,上清液转移至玻璃管,真空干燥仪干燥后,130 μL 95% 乙醇溶解样品。离心所得沉淀用 500 μL 1 mol/L NaOH 溶解,Lowry 法蛋白定量。酶法定量测定细胞内游离胆固醇(free cholesterol, FC)和总胆固醇(total cholesterol, TC)含量[3]。Lowry 法检测细胞碎片蛋白含量,以标准化各样本的胆固醇值。总胆固醇含量减去游离胆固醇含量即得胆固醇酯(cholesterol ester, CE)含量。

1.6 总 RNA 提取及 Real time PCR

经转染及不同处理后的 THP-1 源性巨噬细胞,采用 Trizol 法分别提取各组细胞总 RNA。采用 Nino1000 核酸蛋白定量仪测定 RNA 浓度后,对 RNA 样本浓度进行标准化。逆转录来自不同实验组细胞的等量 RNA 为 cDNA(TaKaRa 逆转录试剂盒,大连)。采用不同管 CT 值比较的相对定量法,严格按照 TaKaRa 生物试剂公司操作说明书进行,以 β-actin 为内参照,反应体系 25 μL,在 Opticon 2 Real time PCR Detector 中进行 Real time PCR,检测 pro-IL-1β,MCP-1,SCAP,HMG-CoAR,β-actin mRNA 表达水平。pro-IL-1β 基因上游引物序列:5′-TCC AGG GAC AGG ATA TGG AG-3′,下游引物序列:5′-TCT TTC AAC ACG CAG GAC AG-3′,片段大小 133 bp;MCP-1 基因上游引物序列:5′-AGCATGAAAGTCTCTGCCGCCCTTCTG-3′,下游引物序列:5′- ATTACTTAAGGCATAATGTTTCACA-3′,片段大小 128 bp;SCAP 基因上游引物序列:5′-GGGAACTTCTGGCAGAATGAC-3′,下游引物序列:5′-CTGGTGGATGGTCCCAATG-3′,片段大小 169 bp;HMGCoAR 基因上游引物序列:5′-GGCCCAGTTGTGCGTCTT-3′,下游引物序列:5′-TTTCGAGCCAGGCTTTCACT-3′,片段大小 161 bp;β-actin 基因上游引物序列:5′-CCTGGCACCCAGCACAAT-3′,下游引物序列:5′-GCCGATCCACACGGAGTACT-3′,片段大小 170 bp。反应条件:50 ℃ 120 s,95 ℃ 300 s,然后 95 ℃ 20 s,55 ℃ 20 s,共 40 个循环,最后 95 ℃ 60 s,55 ℃ 60 s。PCR 结果以 Ct 值反应初始模板量,采用比较 Ct 值法($2^{-\Delta\Delta Ct}$)计算目的基因表达水平。

1.7 超滤离心法收集上清

用 2 mL Amicon Ultra 离心过滤管(Merck Millipore 公司)收集细胞培养上清液,按照说明书差速离心,将每管上清液浓缩至体积 100 μL, -20 ℃ 保存,待测蛋白浓度。

1.8 Western blot 检测蛋白表达

经转染及不同处理后的 THP-1 源性巨噬细胞,采用 Lysis Buffer (Sigma, USA)分别提取各组细胞总蛋白。取浓缩后的细胞培养上清液及细胞总蛋白裂解液 5 μL,Lowry 法分别测定蛋白浓度,根据蛋白浓度将各组蛋白样品进行标准化。取等量各组蛋白样品(60 ~ 100 μg)行 SDS-PAGE(10% ~ 12%)电泳,蛋白 Ladder 购于 Fermentas 公司。待溴酚蓝完全泳出后终止电泳。5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 ℃孵育过夜,PBST 洗膜 3 次,二抗室温孵育 1 h,PBST 再次洗膜 3 次,采用 ECL 化学发光试剂及凝胶成像系统检测图像并拍照。以 β-actin 蛋白为内参照。IL-1β 以浓缩细胞培养上清液总蛋白量为内参照。抗 SCAP 单克隆抗体 IgG-9D5 及其他一抗均购于 Santa Cruz (USA)或 Abcam(UK)公司。

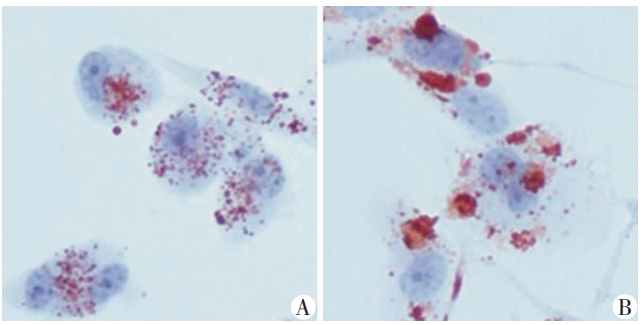
1.9 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个不同处理组各项定量指标的比较采用单因素方差分析,两个不同处理组间比较采用两样本均数 t 检验。$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

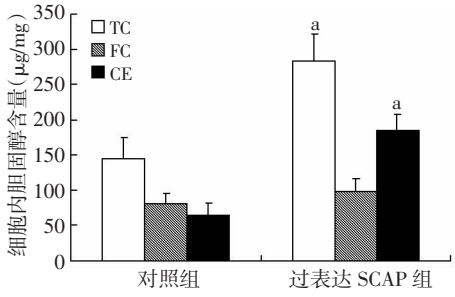
2.1 过表达 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积及炎症因子表达的影响

过表达 SCAP 组 SCAP mRNA 表达量是对照组的(55.84 ± 8.18)倍,其 HMGCoAR mRNA 表达量是对照组的(4.89 ± 0.60)倍,差异有统计学意义($P < 0.01$)。过表达 SCAP 组细胞内中性脂质的聚集显著增加(图 1),TC 及 CE 含量较对照组均显著增多($P < 0.01$),而 FC 含量差异无统计学意义($P > 0.05$,图 2)。过表达 SCAP 组 pro-IL-1β 及 MCP-1 mRNA 表达水平显著增加($P < 0.01$),且其 pro-IL-1β 及上清中 IL-1β 蛋白含量亦显著高于空质粒对照组($P < 0.05$,图 3)



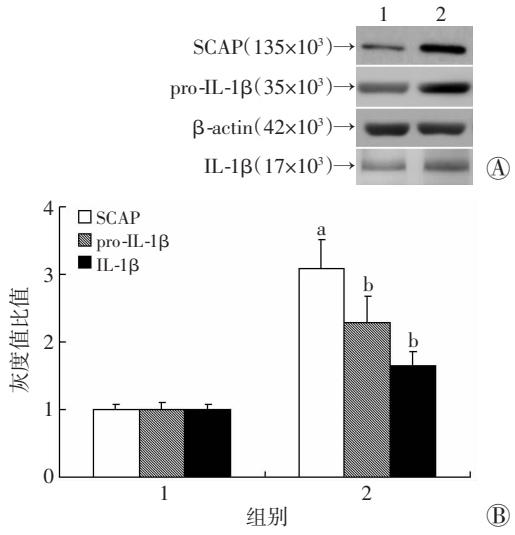
A:对照组;B:过表达 SCAP 组

图 1 油红 O 染色法观察过表达 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积的影响 (LM × 200)



a:$P<0.01$,与对照组比较

图 2 酶法定量检测过表达 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内 TC、FC、CE 含量的影响



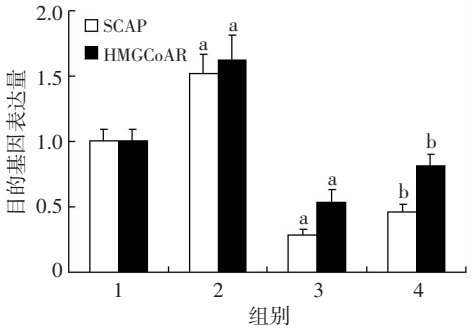
1:对照组;2:过表达 SCAP 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与对照组比较

图 3 Western blot 法检测过表达 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞 pro-IL-1β、IL-1β 表达量的影响

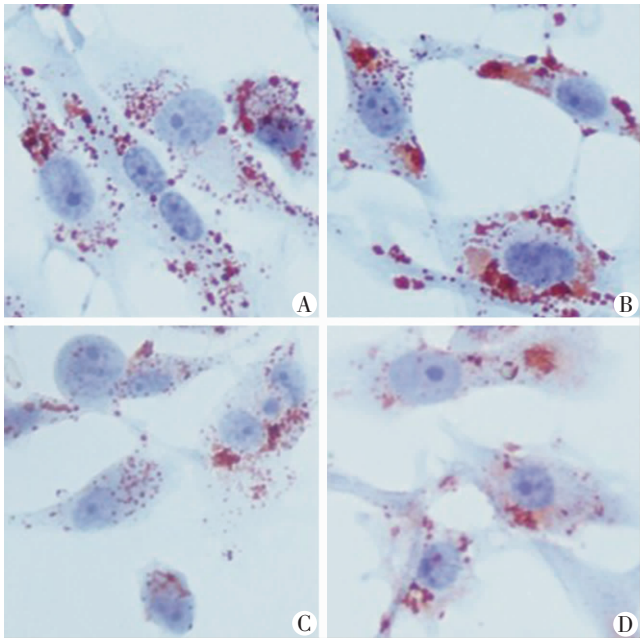
2.2 沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积及炎症因子表达的影响

沉默 SCAP 组 HMGCoAR mRNA 水平均显著低于对照组($P<0.05$),沉默 SCAP + LPS 组 SCAP、HMGCoAR 的 mRNA 表达水平显著高于沉默 SCAP 组($P<0.05$),但仍低于 LPS 组($P<0.05$,图 4)。油红 O 染色提示 LPS 组细胞内中性脂质沉积显著增加,沉默 SCAP 组脂质沉积减少,沉默 SCAP + LPS 组细胞内中性脂质沉积仍少于 LPS 组(图 5)。与油红 O 染色结果相一致,沉默 SCAP 组 TC、CE 含量较对照组均显著下降($P<0.05$),沉默 SCAP + LPS 组 TC、CE 含量低于 LPS 组($P<0.05$),各组间 FC 含量均无显著差别($P>0.05$,图 6)。沉默 SCAP 组 pro-IL-1β 及 MCP-1 mRNA 表达较对照组明显下调($P<0.05$,图 7)。沉默 SCAP + LPS 处理组 pro-IL-1β 及 MCP-1 mRNA 表达较沉默 SCAP 组显著增加($P<0.05$),但显著低于 LPS 组($P<0.05$,图 8)。沉默 SCAP 组 pro-IL-1β 及 IL-1β 蛋白含量显著减少($P<0.05$),沉默 SCAP + LPS 组 pro-IL-1β 及成熟 IL-1β 蛋白含量亦显著低于 LPS 组($P<0.05$,图 8、9)。



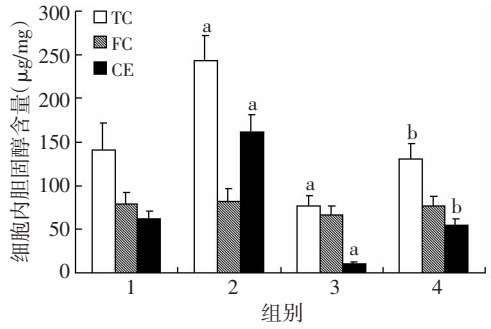
1:对照组;2:LPS 组;3:沉默 SCAP 组;4:沉默 SCAP + LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 LPS 组及沉默 SCAP 组比较

图 4 Real time PCR 检测沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞 SCAP、HMGCoAR mRNA 表达水平的影响



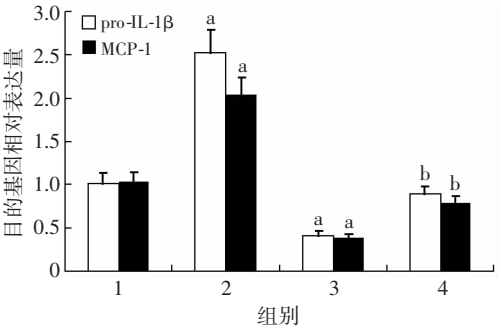
A:对照组;B:LPS 组;C:沉默 SCAP 组;D:沉默 SCAP + LPS 组

图 5 油红 O 染色观察过表达 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积的影响 (LM ×200)



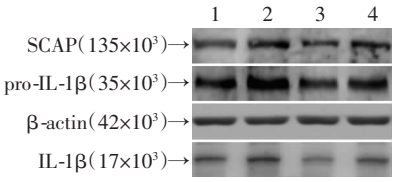
1:对照组;2:LPS 组;3:沉默 SCAP 组;4:沉默 SCAP + LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 LPS 组及沉默 SCAP 组比较

图 6 酶法定量检测沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞内 TC、FC、CE 含量的影响



1:对照组;2:LPS 组;3:沉默 SCAP 组;4:沉默 SCAP + LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 LPS 组及沉默 SCAP 组比较

图 7 Real time PCR 检测沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞中 pro-IL-1β、MCP-1 mRNA 表达的影响

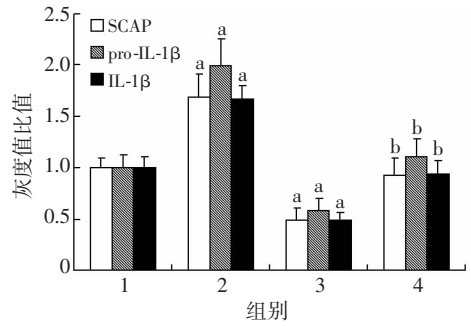


1:对照组;2:LPS 组;3:沉默 SCAP 组;4:沉默 SCAP + LPS 组

图 8 Western blot 检测沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞 SCAP、pro-IL-1β 及上清中 IL-1β 含量的影响

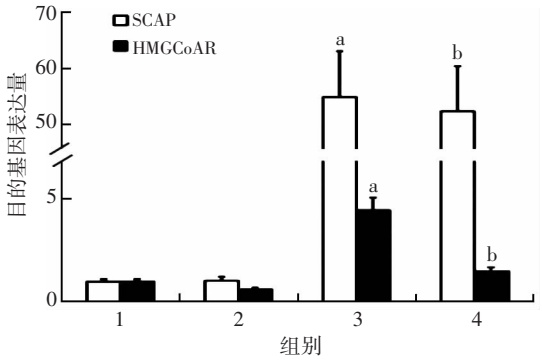
2.3 抑制 SCAP 向高尔基体转位对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积及炎症因子表达的影响

Betulin 处理对 SCAP mRNA 及其蛋白表达无显著影响($P>0.05$),过表达 SCAP + Betulin 组 HMGCoAR mRNA 表达较过表达 SCAP 组显著下降($P<0.01$,图 10)。油红 O 染色显示:过表达 SCAP 组细胞内中性脂质沉积显著增加,加入 Betulin 则显著减少中性脂质含量(图 11)。与对照组相比,过表达 SCAP 组细胞内 TC、CE 水平显著增加($P<0.01$)。与过表达 SCAP 组相比,过表达 SCAP + Betulin 组 TC、CE 含量显著下降($P<0.05$,图 12)。过表达 SCAP 组较对照组 pro-IL-1β 及 MCP-1 mRNA 表达上调($P<0.01$),而 Betulin 处理并不影响上述两种炎症因子 mRNA 的表达($P>0.05$,图 13)。蛋白检测结果也提示 Betulin 不影响 SCAP 及 pro Il-1β、上清中成熟 IL-1β 的含量(图 14)。



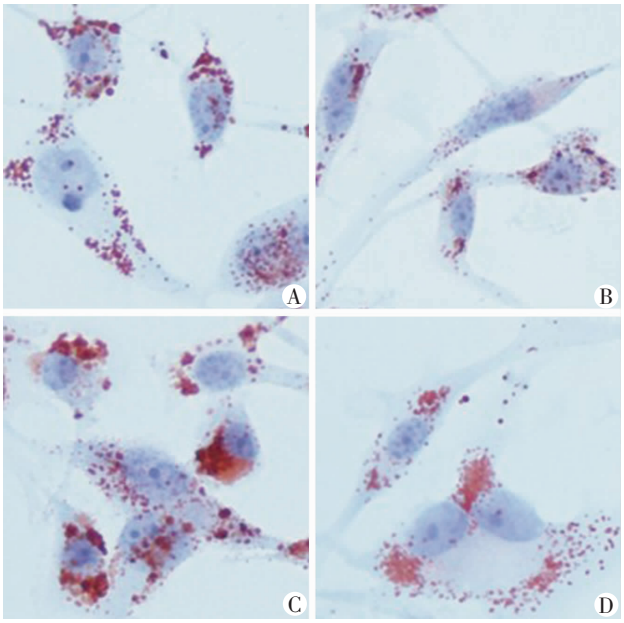
1:对照组,2:LPS 组,3:沉默 SCAP 组,4:沉默 SCAP + LPS 组 a:$P<0.05$,与对照组比较;b: $P<0.05$,与 LPS 组及沉默 SCAP 组比较

图 9 定量分析沉默 SCAP 对 THP-1 源性巨噬细胞 pro-IL-1β、IL-1β 表达的影响



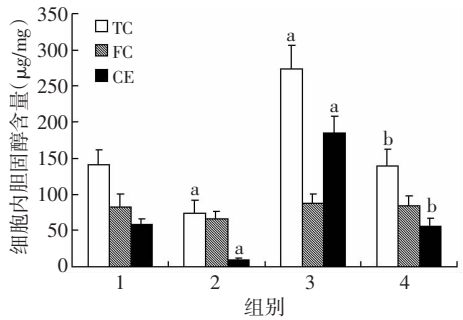
1:对照组;2:Betulin 组;3:过表达 SCAP 组;4:过表达 SCAP + Betulin 组 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Betulin 组及过表达 SCAP 组比较

图 10 Real time PCR 检测抑制 SCAP 转位对 THP-1 源性巨噬细胞 SCAP, HMGCoAR mRNA 表达量的影响



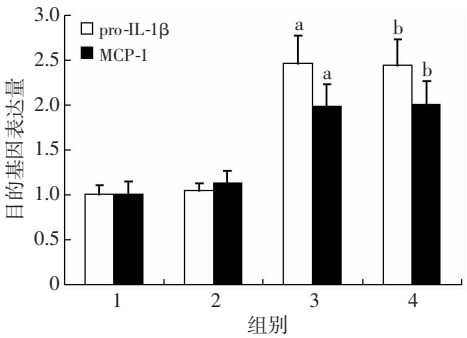
A:对照组;B: Betulin 组;C:过表达 SCAP 组;D:过表达 SCAP + Betulin 组

图 11 油红 O 染色观察抑制 SCAP 转位对 THP-1 源性巨噬细胞内脂质沉积的影响 (LM ×200)



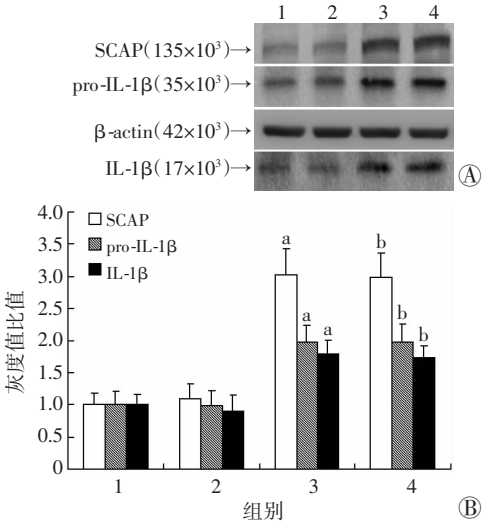
1:对照组;2:Betulin 组;3:过表达 SCAP 组;4:过表达 SCAP + Betulin 组 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Betulin 组及过表达 SCAP 组比较

图 12 酶法定量检测抑制 SCAP 转位对 THP-1 源性巨噬细胞内 TC、FC、CE 含量的影响



1:对照组;2:Betulin 组;3:过表达 SCAP 组;4:过表达 SCAP + Betulin 组 a:$P<0.01$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Betulin 组比较

图 13 Real time PCR 检测抑制 SCAP 转位对 THP-1 源性巨噬细胞 pro-IL-1β、MCP-1 mRNA 表达水平的影响



1:对照组;2:Betulin 组;3:过表达 SCAP 组;4:过表达 SCAP + Betulin 组

A:Western blot 检测;B:半定量分析 a:$P<0.05$,与对照组比较;b:$P<0.05$,与 Betulin 组比较

图 14 Western blot 检测抑制 SCAP 转位对 THP-1 源性巨噬细胞 SCAP、pro-IL-1β 及上清中 IL-1β 含量的影响

3 讨论

SCAP 是一个内质网膜蛋白,其 NH_2-末端区含有固醇敏感区,能感受细胞内胆固醇水平的变化,因此 SCAP 被认为是一个细胞内的胆固醇敏感器。生理状态下,SCAP 与胰岛素诱导基因产物(insulin-induced gene,Insig)和 SREBP 两种蛋白质相互作用,构成一个依赖于细胞内胆固醇水平的负反馈调控系统,共同维持细胞内胆固醇稳态[9]。当细胞内胆固醇浓度高达一定水平时,内质网内的胆固醇含量随之增高,并诱导 SCAP 分子构象发生改变,从而促使 Insig 与 SCAP 的固醇敏感区结合[10],以 Insig-SCAP-SREBP2 复合物的形式将 SREBP2 锚定于内质网上,SREBP2 将不会被激活,LDLr 和内源性胆固醇合成的限速酶 HMGCoAR 转录降低,胆固醇摄取与内源性合成减少。当细胞内缺乏胆固醇时,SCAP 的固醇敏感区感受到此变化,其分子构象随即发生改变,使 Insig 与 SCAP 脱离,从而 SCAP 运载 SREBP2 从内质网转位至高尔基体,然后 SREBP2 在高尔基体经蛋白酶 SIP(site 1 protease)和 S2P (site 2 protease)的两步顺序性水解作用下,其活性氨基端片段从膜上游离下来,入核与 LDLr 基因和 HMGCoAR 基因增强子上的胆固醇调节元件特异性结合,从而增强 LDLr 及 HMGCoAR 基因转录,使 LDLr 和 HMGCoAR 表达增加,导致胆固醇摄取与合成增多。研究证实,糖尿病、炎症等多种病理状态下,外周组织

细胞内 SCAP 发生功能失调,成为加速疾病发生发展的重要机制[2-4]。本研究证实,过表达 SCAP,导致 HMGCoAR 表达增加,从而使细胞内胆固醇内源性合成增多,细胞内脂质沉积显著增加。相反,沉默 SCAP,胆固醇内源性合成的限速酶 HMGCoAR 表达减少,从而使内源性胆固醇合成减少,细胞内脂质沉积减少。

单核巨噬细胞的活化伴随 IL-1β、MCP-1、TNF-α 等多种炎症因子的成熟与分泌。上述各种炎症因子构成了动脉粥样硬化、慢性肾脏病等慢性炎症性疾病的致病微环境。其中,IL-1β 的成熟与分泌需要两个步骤[11]。首先,NF-κB 信号通路活化后,生成 pro-IL-1β。其次,钾离子外流,或者活性氧、溶酶体破裂等因素活化 Nod 样受体蛋白 3(Nod-like receptor protein3,NLRP3)炎性体,形成具有酶活性的异二聚体 caspase-1,将无活性的 pro-IL-1β 剪切为成熟的 IL-1β,诱导机体炎症反应[12]。本研究发现,SCAP 不仅是 THP-1 源性巨噬细胞胆固醇稳态的关键调控分子,同时还参与调节 THP-1 源性巨噬细胞 IL-1β、MCP-1 等炎症因子的表达与分泌,介导炎症反应。在 THP-1 源性巨噬细胞中过表达 SCAP 能够上调 pro-IL-1β 及 MCP-1 的表达,并促进 pro-IL-1β 成为成熟的 IL-1β 从而向胞外分泌。而沉默 SCAP 则显著抑制了炎症因子 IL-1β、MCP-1 生成,减少 IL-1β 向胞外分泌。SCAP 除参与胆固醇稳态调节外,可能还参与炎症反应的调控。

SCAP 从内质网向高尔基体转位,是其激活下游 HMGCoAR 靶基因转录的关键步骤。本研究应用 Betulin 抑制 THP-1 源性巨噬细胞 SCAP 转位能够使细胞内 HMGCoAR 表达及中性脂质蓄积显著减少,但并不影响 SCAP 的表达,也不能抑制 pro-IL-1β、MCP-1 的表达,以及成熟 IL-1β 向细胞外的分泌。这一重要发现表明:SCAP 转位及其介导的胆固醇代谢过程与其介导的炎症反应可能无关,SCAP 功能失调刺激细胞炎症反应的作用并不依赖于其介导的胆固醇稳态调节功能。

脂质代谢紊乱与炎症是动脉粥样硬化、慢性肾脏病等临床疾病的重要危险因素。SCAP 作为胆固醇敏感器,对维持细胞内胆固醇稳态起到重要作用,其功能失调将导致细胞内脂质沉积,引起血管、肾脏等组织器官损伤。本研究发现 SCAP 功能失调能够促进 THP-1 源性巨噬细胞 IL-1β 等炎症因子表达,促进炎症反应,并且这一作用不依赖于其介导的胆固醇稳态调节功能。这可能是 SCAP 独立于其传统胆固醇稳态调节作用之外的潜在新功能。

参考文献:

[1] Usman A, Ribatti D, Sadat U, *et al*. From Lipid Retention to Immune-Mediate Inflammation and Associated Angiogenesis in the Pathogenesis of Atherosclerosis [J]. J Atheroscler Thromb, 2015, 22(8):739-749. DOI:10.5551/jat.30460

[2] Ye Q, Chen Y, Lei H, *et al*. Inflammatory stress increases unmodified LDL uptake via LDL receptor: an alternative pathway for macrophage foam-cell formation[J]. Inflamm Res, 2009, 58(11):809-818. DOI:10.1007/s00011-009-0052-4

[3] Chen Y, Ku H, Zhao L, *et al*. Inflammatory stress induces statin resistance by disrupting 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase feedback regulation[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014, 34(2): 365-376. DOI:10.1161/ATVBAHA.113.301301

[4] Zhong S, Zhao L, Li Q, *et al*. Inflammatory Stress Exacerbated Mesangial Foam Cell Formation and Renal Injury via Disrupting Cellular Cholesterol Homeostasis[J]. Inflammation, 2015, 38(3):959-971. DOI:10.1007/s10753-014-0058-0

[5] Van-Rooyen D M, Farrell G C. SREBP-2: a link between insulin resistance, hepatic cholesterol, and inflammation in NASH[J]. J Gastroenterol Hepatol, 2011, 26(5):789-792. DOI:10.1111/j.1440-1746.2011.06704.x

[6] Chen Y, Zhao L, Li Q, *et al*. Inflammatory stress reduces the effectiveness of statins in the kidney by disrupting HMGCoA reductase feedback regulation[J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(10):1864-1878. DOI:10.1093/ndt/gfu203

[7] Tang J J, Li J G, Qi W, *et al*. Inhibition of SREBP by a small molecule, betulin, improves hyperlipidemia and insulin resistance and reduces atherosclerotic plaques [J]. Cell Metab, 2011, 13(1):44-56. DOI:10.1016/j.cmet.2010.12.004

[8] Li L C, Varghese Z, Moorhead J F, *et al*. Cross-talk between TLR4-MyD88-NF-κB and SCAP-SREBP2 pathways mediates macrophage foam cell formation[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013, 304(6):H874-H884. DOI:10.1152/ajpheart.00096.2012

[9] Dong X Y, Tang S Q, Chen J D. Dual functions of Insig proteins in cholesterol homeostasis[J]. Lipids Health Dis, 2012, 11:173. DOI:10.1186/1476-511X-11-173

[10] Huber M D, Vesely P W, Datta K, *et al*. Erlins restrict SREBP activation in the ER and regulate cellular cholesterol homeostasis[J]. J Cell Biol, 2013, 203(3):427-436. DOI:10.1083/jcb.201305076

[11] Lorenz G, Darisipudi M N, Anders H J. Canonical and non-canonical effects of the NLRP3 inflammasome in kidney inflammation and fibrosis[J]. Nephrol Dial Transplant, 2014, 29(1):41-48. DOI:10.1093/ndt/gft332

[12] Shaw P J, McDermott M F, Kanneganti T D. Inflammasomes and autoimmunity[J]. Trends Mol Med, 2011, 17(2):57-64. DOI:10.1016/j.molmed.2010.11.001

(**收稿**:2015-09-20;**修回**:2015-11-20)

(编辑 栾 嘉)